

実験的尿毒症における大脳皮質アミノ酸代謝に関する研究

—— とくにグルタミン酸代謝を中心として ——

菊 池 進

札幌医科大学内科学第 1 講座 (主任 谷内 昭教授)

Studies on Amino Acid Metabolism of Cerebral Cortex in Experimental Uremia with Special Reference to Glutamate Metabolism

Susumu KIKUCHI

Department of Internal Medicine (Section 1), Sapporo Medical College

(Chief : Prof. A. Yachi)

In order to investigate the role of amino acid metabolism in uremic encephalopathy, the changes in free amino acids in serum and cerebral cortex were measured in uremic rats. Subsequently the uptake of L-(U-¹⁴C) glutamate by cerebral cortical slices and its metabolites were studied. The results obtained were as follows;

1) Uremic rats developed weakness, tremors, muscular twitchings and stupor along with the chemical changes in the serum characteristic of uremia.

2) In serum obtained from uremic rats, aspartate, glycine, 3-methylhistidine, α -aminoadipic acid, cystine and γ -aminobutyrate (GABA) were significantly increased. On the contrary, glutamate, valine, leucine, lysine, tryptophan and tyrosine were significantly reduced. Tyrosine/phenylalanine ratio, valine/glycine ratio and essential amino acids/nonessential amino acids ratio were also apparently reduced.

3) In uremic cerebral cortex, aspartate, glutamine, glycine, histidine, ornithine, phenylalanine, phosphoethanolamine, taurine, 1-methylhistidine and 3-methylhistidine were significantly increased. Carnosine, glutamate and arginine disclosed a significant reduction.

4) Uremic brain did not demonstrate chemical changes of edema.

5) L-¹⁴C-glutamate uptake and incorporation into aspartate, glutamate, glutamine, γ -aminobutyrate and CO₂ by cerebral cortical slices were markedly decreased in uremic rats.

6) When compared with the percent activity of each metabolite in the total radioactivity recovered, glutamate and aspartate were decreased. In contrast, however, glutamine, γ -aminobutyrate and CO₂ revealed moderately enhanced activities. These findings supported the hypothesis that glutamate utilization by TCA cycle was markedly suppressed, while glutamine synthesis and GABA shunt were relatively intact in uremic brain.

(Received February 2, 1981 and accepted February 16, 1981)

1 結 言

尿毒症においては易疲労性、集中力低下、記憶・記銘力障害、意識障害、痙攣をはじめ多彩な精神神経症状が出現し、尿毒症性脳症として総括されている^{1~6)}。そ

の成因に関しては代謝面における種々の研究が行われ、臨床的にはとくに urea, creatinine などの代謝性アミノ酸をはじめ種々の蛋白・アミノ酸代謝異常が検索されてきたがなお不明な点が多い。

近年、 γ -aminobutyrate(GABA), glutamate(Glu)

, aspartate(Asp), taurine などのアミノ酸は神経伝達物質として, また tryptophan(Trp), tyrosine(Tyr) および histidine(His) などは活性アミンの前駆物質として中枢神経系において重要な役割を演じていることが明らかにされつつある⁷⁾。しかし, 尿毒症性脳症におけるこれらの脳アミノ酸の代謝動態については未だ明らかにされていない。

当講座においては諸種代謝性脳症についてこのようなアミノ酸代謝異常を追究しつつあるが, 本研究ではその一環として尿毒症性脳症をとりあげ, 実験的にラットに急性および慢性尿毒症を作製し, 血清アミノ酸と対比しつつ, 脳内に最も高濃度に存在し glutamine (Gln), GABA, Asp の合成および α -ketoglutarate を介して糖質代謝とも密接に関連する Glu を中心に大脳皮質アミノ酸代謝を解析しその異常を明らかにすべく検討を加えた。

2 実験方法

2.1 実験動物

オリエンタル固型飼料 NMF(蛋白質 28%, 脂質 5%, 糖質 48%)を与え飼育した Wistar 系雄ラットを用いた。体重は正常対照および急性尿毒症ラットは 190~210 g, 慢性尿毒症ラットは 260~380 g であった。

2.2 尿毒症ラットの作製

急性尿毒症はラットをエーテル麻酔下に腹部正中切開を施し, 両側尿管を腎盂より 2 cm の部位で結紮して作製した。術後は絶食とし, 水分のみ自由に与え 48 時間後断頭し実験に供した。

慢性尿毒症はラットをエーテル麻酔下に腹部正中切開を行い, 左腎の $\frac{2}{3}$ (上極および下極)を部分切除し, 1 週間後背部に縦切開を施し右腎を摘出し作製した。術後 4 カ月間オリエンタル固型飼料 NMF を与えて飼育し, 血清 BUN が 70 mg/dl 以上であることを確認し実験に供した。

正常対照ラットは sham operation として腹部正中切開を施した。

実験に際しては, いずれの場合も急性尿毒症ラット同様, 食餌摂取による影響をさけるため断頭前 48 時間は絶食とし水分のみ自由に与えた。また断頭は無麻酔で行った。

2.3 血清アミノ酸の測定

断頭採取した血液より血清を分離し, その 1 ml に 2% スルフォサリチル酸水溶液 1 ml を加え約 15 分間振盪の後, 3,000 r. p. m. で 15 分間遠心し上清を分離しアミノ酸分析に供した。測定は日立 835 型アミノ酸分析計

によったが, 溶出溶媒としてはクエン酸リチウム緩衝液を, また発色試薬にはニンヒドリンを用いた。

2.4 大脳皮質の蛋白濃度および水分含量

ラットは断頭後直ちに脳を摘出し, 脳表面の脳膜および血管を除去し大脳皮質を Stadie-Riggs tissue slicer により厚さ 0.5 mm の切片とし, torsion balance により湿重量を測定した。蛋白濃度は Lowry et al.⁸⁾の方法により牛血清アルブミンの標準液溶を用いて定量した。また, 水分含量は大脳皮質切片を 110°C, 8 時間加熱乾燥しその重量を測定し, 同切片の湿重量との差より求めた。

2.5 大脳皮質遊離アミノ酸の測定

大脳皮質切片 (80~100 mg) にその湿重量の 15 倍量の 75% エタノールを加え Teflon pestle 付 Potter-Elvehjem 型 homogenizer により homogenize した後, 3,000 r. p. m., 15 分遠心し上清をとる。沈渣を再度同様に homogenize した後遠心しこの上清を上述の上清へ加える。この上清を送風下に乾燥させた後, 蒸溜水 0.5 ml を加え再溶解させる。これに水飽和クロロホルム 3 ml を加え振盪後 3,000 r. p. m. 10 分間遠心すると下から順に, クロロホルム層, タンパク層および水層の 3 層に分離する。この水層部分を試料とし, 2・3 項に記した方法によりアミノ酸を日立 835 型アミノ酸分析計により測定した。

2.6 大脳皮質切片による L-[U-¹⁴C]glutamate の取り込み

2.6.1 大脳皮質切片の作製

2.4 項と同様に無麻酔下にラットを断頭後, 直ちに脳を摘出し氷冷低温下 (3~5°C) の Gey's balanced salt solution (NaCl 120.0 mM, Na₂ HPO₄ · H₂O 0.8 mM, KH₂PO₄ 0.2 mM, MgCl₂ 1.0 mM, CaCl₂ (anhyd.) 1.5 mM, Glucose 5.5 mM, NaHCO₃ 27.0 mM, KCl 5.0 mM, PH 7.4) へ浸す。脳表面の脳軟膜や血管を除去し Stadie-Riggs tissue slicer を用い厚さ 0.5 mm の大脳皮質切片を作り, その湿重量を torsion balance により測定した。

2.6.2 大脳皮質切片による L-[U-¹⁴C]glutamate の取り込み

上述の大脳皮質切片を氷冷した Gey's balanced salt solution 内で 10 分間浸した後, Gey's balanced salt solution 3.0 ml に L-glutamate 2 mM, L-[U-¹⁴C]glutamate 0.5 μ Ci (Amersham, 290 mCi/mmol) を medium とし, あらかじめこれに 100% O₂ 気泡を 5 分間通した後, 気相を O₂ で置換しておき, 37°C で振盪しながら孵置した。

2・6・3 $^{14}\text{CO}_2$ の捕捉および測定

Incubation 中に生成する $^{14}\text{CO}_2$ は Fig. 1 に示す装置を用いて 25% β -phenylethylamine (methanol)(v/v) 0.3 ml をあらかじめ加えた Whatman No. 3 濾紙 (1.7×8.5 cm) で捕捉した。さらに incubation 終了時 2 N・HCl 0.5 ml を加え 1 時間放置した後, Insta Gel 5 ml を加え液体シンチレーションカウンターにより放射能を測定した。

2・6・4 大脳皮質切片アミノ酸の抽出・分離

大脳皮質切片は氷冷生理食塩水で 3 回洗浄した後, 2.5 項と同様に 75% エタノールで 2 度 homogenize し遠心上清をとり, 風乾後蒸留水 0.5 ml で再溶解した。これに水飽和クロロホルム 3 ml を加え遠心しその上清を試料とした。この一定量を cellulose 薄層クロマトグラフィーに送風下にスポットし, phenol: 水 (75: 25 v/v) を用いて上昇法により一次展開し, 次いで n-butanol: acetate: 水 (60: 15: 25 v/v) を溶媒として二次展開を行った。その後 0.15% ninhydrin-ethanol 溶液を噴霧し 70°C, 20 分間加熱発色させ, 各アミノ酸スポットを切り出し蒸留水 0.5 ml を加えて, 56°C で 1 時間振盪した後 Insta Gel 5 ml を加え, 液体シンチレーションカウンターにより放射能を測定した。以上の $^{14}\text{CO}_2$ の捕捉および各アミノ酸の分離・抽出過程はその概略

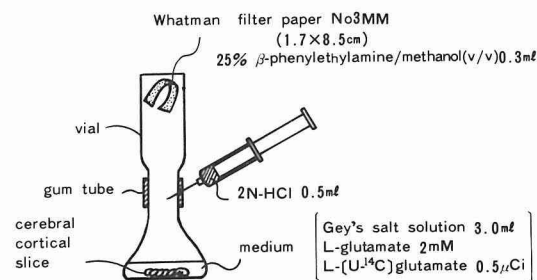


Fig. 1 Apparatus for incubation and trapping of $^{14}\text{CO}_2$

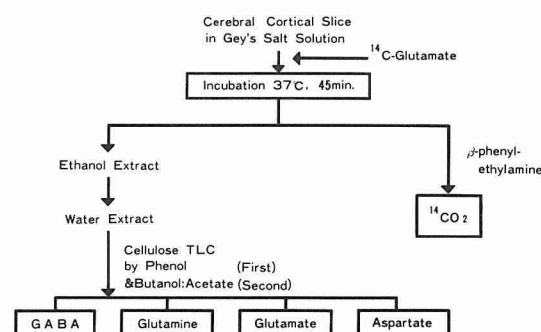


Fig. 2 Isolation procedure of ^{14}C -glutamate metabolites

を Fig. 2 にまとめて示した。

3 実験成績

3・1 尿毒症症候群の出現

尿毒症ラットでは毛の粗造化, 筋力低下, 歩行異常, 全身の振戦, 被刺激性の亢進, 逆に刺激に対する反応性低下, 頻度は少ないが痙攣などの異常を認めた。また慢性尿毒症ラットの末期では出血傾向も認められた。急性尿毒症ラットの LD₅₀ time は約 60 時間であり, 慢性尿毒症ラットでは 4 カ月で約 20% が死亡した。

3・2 血液生化学的变化

血清 BUN, creatinine, K⁺ および Ca⁺⁺ の測定値を Table 1 に示した。BUN は急性尿毒症ラット 276.8±22.3 mg/dl, 慢性尿毒症ラット 120.2±49.8 mg/dl で, 正常ラット 14.6±0.6 mg/dl に比較して約 10~20 倍の増加を認めた (P<0.01)。creatinine は急性および慢性尿毒症ラットでそれぞれ 7.1±0.4 mg/dl, 4.2±1.3 mg/dl と正常ラット 1.1±0.1 mg/dl の 4~7 倍の増加を示した (P<0.01)。K⁺ も急性群 9.8±0.6 mEq/l, 慢性群 8.8±0.9 mEq/l であり正常ラット 5.8±0.3 mEq/l に比較して尿毒症ラット群で有意の増加を示した (P<0.01)。これに対し Ca⁺⁺ には変化を認めなかった。以上の血液生化学的パラメーターはいずれも明らかに尿毒症の所見に一致する値を示した。その変化の程度はいずれも慢性群よりも急性群においてより著明に認められた。

3・3 血清遊離アミノ酸の変動

尿毒症ラットにおいて有意の濃度増加を認めたアミノ酸群, 減少したアミノ酸群, 尿毒症ラットでのみ検出・測定されたアミノ酸群の 3 群に分けて Table 2 にまとめて示した。

増加したアミノ酸は Asp, Gly, 3-methylhistidine, urea, 減少したアミノ酸は Glu, tyrosine(Tyr), tryptophan(Trp), leucine(Leu), valine(Val), lysine(Lys) であり, また尿毒症ラットでのみ認められ

Table 1 Serum profiles of uremic rats

	Normal (n=6)	Acute Uremia (n=6)	Chronic Uremia (n=6)
BUN (mg/dl)	14.6±0.6	276.8±22.3*	120.2±49.8*
Creatinine (mg/dl)	1.1±0.1	7.1±0.4*	4.2±1.3*
K ⁺ (mEq/L)	5.8±0.3	9.8±0.6*	8.8±0.9*
Ca ⁺⁺ (mEq/L)	4.9±0.1	5.1±0.3	5.0±0.2

* : significantly elevated (P<0.01)

Table 2 Changes of serum amino acids in uremic rats (μmoles/100ml) (mean±S.D.)

Amino acids	(a) Normal Control	(b) Acute Uremia	(c) Chronic Uremia	P Value	
	(n=5)	(n=5)	(n=5)	(a) vs (b)	(a) vs (c)
Elevated Group					
Aspartate	3.47±1.32	9.22±3.73	8.65±1.78	<0.05	<0.01
Glycine	34.74±8.93	33.57±7.91	47.79±9.57	NS	<0.05
3-methylhistidine	0.74±0.14	9.40±0.73	3.73±0.60	<0.01	<0.01
Urea	35.15±0.95	236.63±74.6	65.60±8.01	<0.01	<0.01
Reduced Group					
Glutamate	32.15±4.53	18.56±4.09	20.76±3.95	<0.01	<0.01
*Leucine	20.41±2.27	14.19±2.39	12.76±4.88	<0.01	<0.05
*Lysine	36.43±6.78	25.96±3.78	38.00±4.99	<0.05	NS
*Tryptophan	8.65±1.63	1.87±0.54	3.24±0.67	<0.01	<0.01
Tyrosine	7.37±2.41	3.81±0.93	3.62±1.73	<0.05	<0.05
*Valine	20.56±1.80	11.51±1.39	10.29±5.45	<0.01	<0.01
Specifically appeared Group					
Citrulline	—	7.06±1.22	13.08±1.76		
α-aminoadipic acid	—	2.15±2.48	3.39±3.11		
Cystine	—	4.50±0.96	5.24±5.89		
γ-aminobutyrate (GABA)	—	—	0.78±0.10		

NS : not significant, * : essential amino acids

たアミノ酸はcitrulline, α-aminoadipic acid, cystine, GABAであった。これらのうち, GlyとGABAは慢性群でのみ, またLysは急性群でのみ有意の変化を認めた。必須アミノ酸(EA)で増加したものは無く, 逆に減少した6アミノ酸のうちEAが4つ(Leu, Val, Lys, Trp)を占め, EAの低下傾向が認められた。

急性尿毒症と慢性尿毒症の比較では, GlyおよびGABAのように慢性群でのみ増加したものの, またLysのように急性群でのみ減少したものなどがあるが, 一般的にみて両群の間に本質的な差はなく同一の変動傾向がみられた。

尿毒症における特徴的な血清アミノ酸パターンを検索するためTyr/Phe比, Val/Gly比, および必須アミノ酸(EA: Lys+Trp+Thr+Val+Met+Ile+Leu+Phe+His)と非必須アミノ酸(NEA: Arg+Asp+Ser+Asn+Glu+Pro+Ala+Gly)の比(EA/NEA比)を求めFig. 3に示した。

Tyr/Phe比は正常ラット0.84±0.19に対し急性尿毒症ラット0.44±0.10, 慢性尿毒症ラット0.48±0.14といずれも有意の減少を認めた(P<0.01)。

Val/Gly比は正常ラット0.96±0.17に対し急性尿毒症ラット0.51±0.11, 慢性尿毒症ラット0.34±0.20といずれも著明に低下した。

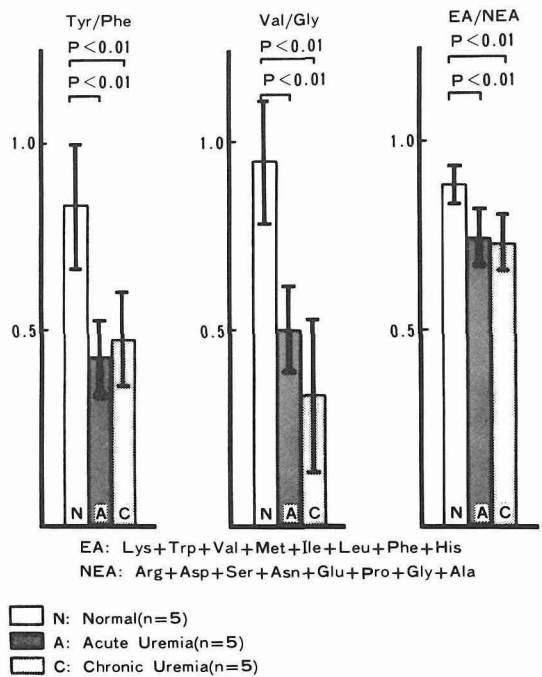


Fig. 3 Changes of serum amino acid profile in uremic rats

EA/NEA 比も正常ラット 0.89 ± 0.04 , 急性尿毒症ラット 0.76 ± 0.08 , 慢性尿毒症ラット 0.74 ± 0.08 であり尿毒症群において有意の低下を示した ($P < 0.01$).

3・4 大脳皮質水分量および蛋白量

大脳皮質水分量は正常ラット $81.6 \pm 0.3\%$, 急性尿毒症ラット $81.4 \pm 0.2\%$ および慢性尿毒症ラット $81.3 \pm 0.2\%$ と尿毒症群において軽度の減少傾向がうかがわれるが, 有意差は認められなかった (Table 3).

また蛋白量も大脳皮質湿重量 (g) あたり正常ラットでは 124.4 ± 1.6 mg であるのに対し, 急性尿毒症ラット 126.6 ± 4.8 mg および慢性尿毒症ラット 126.2 ± 2.0 mg で, 有意の変化はみられなかった (Table 4).

以上の成績より尿毒症ラット群では脳浮腫は随伴しないと判断された.

3・5 大脳皮質アミノ酸の変動

成績を Table 5 にまとめて示した. 急性あるいは慢

Table 3 Water content of cerebral cortex in normal and uremic rats (mean \pm S.D.)

Water content (%)		
Normal	81.6 ± 0.3	(n=4)
Acute Uremia	81.4 ± 0.2	(n=4)
Chronic Uremia	81.3 ± 0.2	(n=3)

性いずれかの尿毒症ラットにおいて有意に増加した大脳皮質アミノ酸は Asp, Gln, Gly, His, Phe, ornithine, phosphoethanolamine, taurine, urea である. これに対し Glu, Arg, carnosine は有意に低下し, また 1-methylhistidine, 3-methylhistidine は尿毒症群でのみ検出された.

血清中で増加を示した Asp, Gly, 3-methylhistidine および urea はいずれも大脳皮質においても増加を認めた. これに対し Glu は血清では急性群および慢性群のいずれでも, また大脳皮質では慢性群において有意の減少を示した ($P < 0.01$). 血清では Leu, Lys, Trp, Val などの必須アミノ酸の減少および EA/NEA 比の有意の低下がみられたが大脳皮質では減少する必須アミノ酸はなく, 逆に His, Phe の両必須アミノ酸の増加を認めた.

急性尿毒症ラットと慢性尿毒症ラットとの比較では,

Table 4 Protein concentration of cerebral cortex in normal and uremic rats (mean \pm S.D.)

Protein concentration (mg/g wet wt.)		
Normal	124.4 ± 1.6	(n=4)
Acute Uremia	126.6 ± 4.8	(n=4)
Chronic Uremia	126.2 ± 2.0	(n=3)

Table 5 Changes of cerebral cortical amino acids in uremic rats (μ moles/g wet wt.) (mean \pm S.D.)

Amino acids	(a) Normal Control (n=5)	(b) Acute Uremia (n=5)	(c) Chronic Uremia (n=5)	P Value	
				(a) vs (b)	(a) vs (c)
Elevated Group					
Aspartate	2.42 ± 0.22	2.91 ± 0.12	2.86 ± 0.18	< 0.01	< 0.01
Glutamine	3.81 ± 0.44	4.60 ± 0.21	4.98 ± 0.54	< 0.01	< 0.01
Glycine	0.62 ± 0.08	0.57 ± 0.09	1.15 ± 0.04	NS	< 0.01
*Histidine	0.02 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.07 ± 0.01	< 0.01	< 0.01
Ornithine	0.02 ± 0.01	0.07 ± 0.02	0.03 ± 0.01	< 0.05	< 0.05
*Phenylalanine	0.05 ± 0.02	0.10 ± 0.01	0.07 ± 0.03	< 0.05	NS
Phosphoethanolamine	1.02 ± 0.25	1.37 ± 0.18	1.65 ± 0.23	< 0.05	< 0.05
Taurine	5.82 ± 0.38	6.44 ± 0.65	6.71 ± 0.74	NS	< 0.05
Urea	4.65 ± 1.61	77.92 ± 25.0	29.79 ± 8.49	< 0.05	< 0.05
Reduced Group					
Carnosine	0.12 ± 0.01	0.09 ± 0.05	0.05 ± 0.01	NS	< 0.01
Glutamate	8.63 ± 0.21	7.95 ± 0.15	8.23 ± 0.64	< 0.01	NS
Arginine	0.25 ± 0.05	0.16 ± 0.06	0.07 ± 0.03	NS	< 0.01
Specifically appeared Group					
1-methylhistidine	—	0.02 ± 0.01	0.06 ± 0.01		
3-methylhistidine	—	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.01		

NS : not significant,

* : essential amino acids

Gly が前者で軽度減少し、後者では逆に有意に増加 ($P < 0.05$) を認めた以外、血清アミノ酸と同様に両者の間に本質的な差を認めなかった。

脳の主要な遊離アミノ酸である Glu, Gln, Asp および GABA についてみると、この4つのアミノ酸で脳の α -アミノ窒素の%以上を占めるのであるが、両群の尿毒症ラット大脳皮質においては Asp, Gln が増加し、Glu は減少し、GABA は不変であった。

3・6 L-[U- 14 C]glutamateの大脳皮質切片による取り込み

正常ラット大脳皮質切片による L-[U- 14 C]glutamate の取り込みを経時的に観察して Fig. 4 に示した。放射能は Glu, Asp, Gln, GABA および CO_2 に認められた。Incubation 時間は 15, 30, 45 および 60 分としたが各アミノ酸の放射能はほぼ直線的に増加した。

その放射能は Glu, Asp, Gln, GABA の順に強く、約 40:6:3:1 の比率であった。 $^{14}\text{CO}_2$ は incubation 時間が 30 分を越えると上昇を示し以後 60 分まではほぼ直線的に増加した。

急性および慢性尿毒症ラットにおける成績をそれぞれ Fig. 5 および Fig. 6 に示した。両群ともに放射能は Glu, Asp, Gln, GABA および CO_2 に認められたが、そ

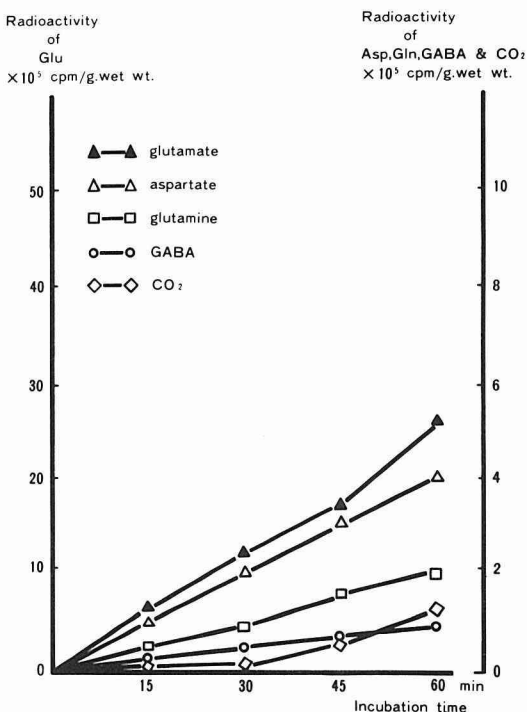


Fig. 5 Time course changes of ^{14}C -glutamate metabolites in cerebral cortical slices of acute uremic rats

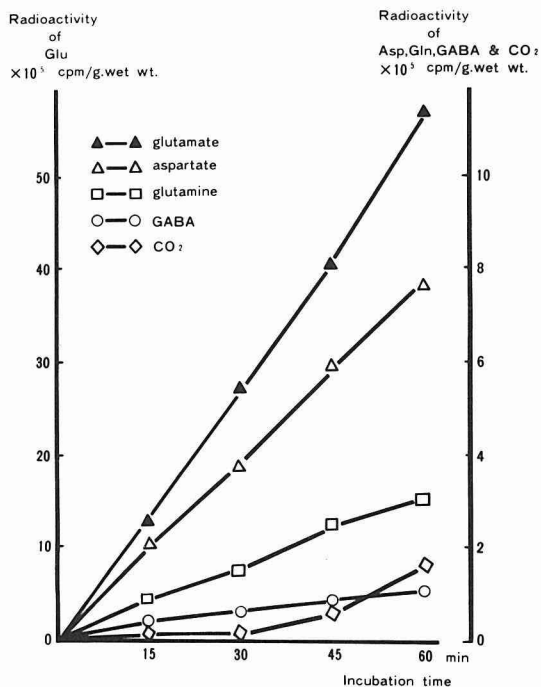


Fig. 4 Time course changes of ^{14}C -glutamate metabolites in cerebral cortical slices of normal rats

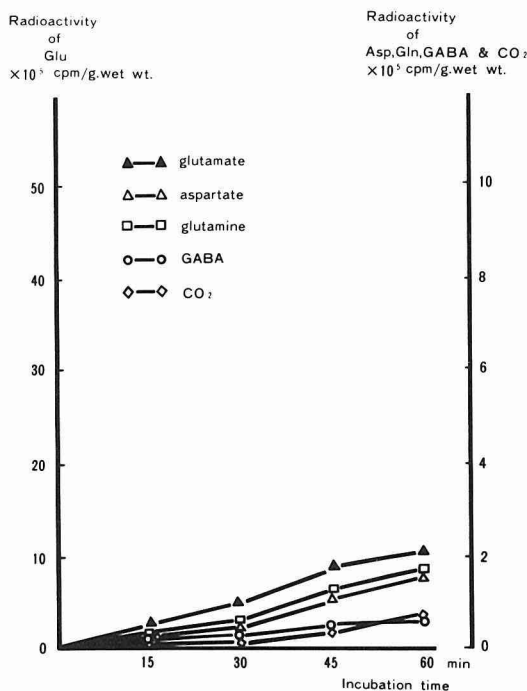


Fig. 6 Time course changes of ^{14}C -glutamate metabolites in cerebral cortical slices of chronic uremic rats

の強さは正常ラットに比し著明に減少し、その程度は慢性尿毒症ラットにおいてより顕著であった。尿毒症ラットでも各アミノ酸および $^{14}\text{CO}_2$ はincubationの時間が30分から60分までの間では直線的に増加し、正常ラットと同様の態度を示した。それゆえ以下の実験においてはincubationの時間を45分と設定した。

Table 6 に正常および尿毒症ラット大脳皮質切片における ^{14}C -glutamateの添加により放射能の取り込みを認めたアミノ酸分画および $^{14}\text{CO}_2$ の放射能の総和をまとめた。各群とも6匹ずつ用いincubationは上述のように45分とした。この場合、大脳皮質切片湿重量(mg)あたりの取り込みをみると正常ラットは $5,115.6 \pm 194.0$ cpm, 急性尿毒症ラット $2,343.2 \pm 310.0$ cpm, 慢性尿毒症ラット $1,086.2 \pm 162.3$ cpmであり、正常群に対して急性尿毒症群は45.8%, 慢性尿毒症群は21.2%と ^{14}C -glutamate取り込みの著しい低下を示した($P < 0.001$)。

各アミノ酸分画および CO_2 における放射能の導入をTable 7に示し、さらにそれらの値について、正常ラットに対する尿毒症ラット間の比率を求めてFig. 7に示

Table 6 Radioactivity recovered from amino acids and trapped $^{14}\text{CO}_2$ after 45 min incubation of rat cerebral cortical slices with L-[U- ^{14}C] glutamate

	Radioactivity (cpm/mg wet wt.) (mean \pm S.D.)	Percentage of normal value (%)
Normal (n=6)	$5,115.6 \pm 194.0$	100
Acute Uremia (n=6)	$2,343.2 \pm 310.0^*$	45.8
Chronic Uremia (n=6)	$1,086.2 \pm 162.3^*$	21.2

* : significantly reduced ($P < 0.001$)

Table 7 Incorporation of L-[U- ^{14}C] glutamate into amino acids and CO_2 after 45 min incubation of cerebral cortical slices of normal and uremic rats (cpm/mg wet wt.)

	(a) Normal Control (n=6)	(b) Acute Uremia (n=6)	(c) Chronic Uremia (n=6)	P Value	
				(a) vs (b)	(a) vs (c)
Glutamate	$4,117.1 \pm 238.6$	$1,800.2 \pm 306.0$ (43.7)	778.6 ± 132.7 (18.9)	< 0.001	< 0.001
Aspartate	600.8 ± 81.1	252.0 ± 38.1 (41.9)	90.8 ± 18.8 (15.1)	< 0.001	< 0.001
Glutamine	250.6 ± 26.3	167.3 ± 20.9 (66.8)	143.6 ± 29.7 (57.3)	< 0.001	< 0.001
GABA	83.8 ± 3.8	67.3 ± 4.9 (80.6)	32.8 ± 4.6 (39.1)	< 0.001	< 0.001
CO_2	74.4 ± 5.3	56.4 ± 5.6 (75.8)	40.4 ± 9.6 (54.3)	< 0.001	< 0.001

values in parenthesis : percent of normal value

した。急性尿毒症ラットでは各分画の正常値に対する割合は CO_2 75.8%, GABA 80.6%, Gln 66.8%, Glu 43.7%, Asp 41.9%であり、慢性尿毒症ラットでは CO_2 54.3%, GABA 39.1%, Gln 57.3%, Glu 18.9%, Asp 15.1%であった。すなわち CO_2 , GABA, Glnに比較してGlu, Aspの低下が著明な点が注目された。

Table 8 および Fig. 8 に各分画の放射能取り込み率をまとめて示した。正常ラットでは $\text{Glu } 80.3 \pm 1.8\%$,

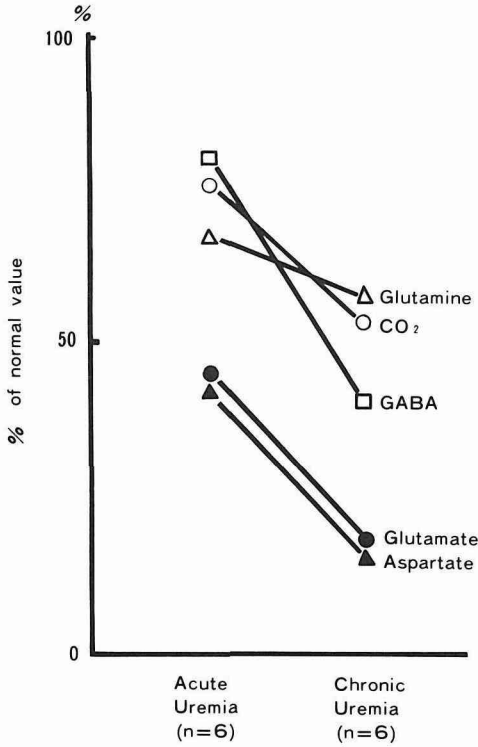
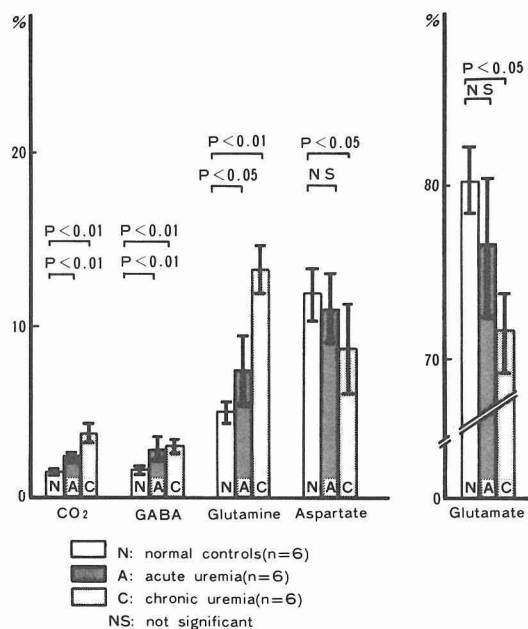


Fig. 7 Radioactivity expressed as percent of normal value

Table 8 Percent incorporation of ^{14}C -glutamate into amino acids and CO_2 after 45 min incubation of rat cerebral cortical slices (%) (mean \pm S.D.)

	(a) Normal Control (n=6)	(b) Acute Uremia (n=6)	(c) Chronic Uremia (n=6)	P Value	
				(a) vs (b)	(a) vs (c)
Glutamate	80.3 \pm 1.8	76.4 \pm 4.0	71.5 \pm 2.4	NS	<0.05
Aspartate	11.7 \pm 1.5	10.9 \pm 1.9	8.6 \pm 2.6	NS	<0.05
Glutamine	4.9 \pm 0.6	7.4 \pm 1.9	13.2 \pm 1.4	<0.05	<0.01
GABA	1.6 \pm 0.1	2.9 \pm 0.6	3.0 \pm 0.4	<0.01	<0.01
CO_2	1.5 \pm 0.1	2.4 \pm 0.2	3.7 \pm 0.6	<0.01	<0.01

NS : not significant

**Fig. 8** Percent incorporation of ^{14}C -glutamate into amino acids and CO_2 after 45 min incubation of rat cerebral cortical slices (%)

Asp 11.7 \pm 1.5%, Gln 4.9 \pm 0.6%, GABA 1.6 \pm 0.1%, CO_2 1.5 \pm 0.1%, 急性尿毒症ラットでは Glu 76.4 \pm 4.0%, Asp 10.9 \pm 1.9%, Gln 4.9 \pm 0.6%, GABA 2.9 \pm 0.6%, CO_2 2.4 \pm 0.2%, 慢性尿毒症ラットでは Glu 71.5 \pm 2.4%, Asp 8.6 \pm 2.6%, Gln 13.2 \pm 1.4%, GABA 3.0 \pm 0.4%, CO_2 3.7 \pm 0.6%であった。急性および慢性尿毒症ラットとも Gln, GABA の放射能取り込み率および $^{14}\text{CO}_2$ 産生能が有意に上昇し ($P < 0.01$), Glu, Asp は慢性尿毒症で有意に減少を示した ($P < 0.05$)。特に慢性尿毒症ラットでは Gln の増加および Asp の減少が著しく, Gln の放射能取り込み率が Asp を上回った点が特徴的であった。

4 考 察

4.1 実験モデルについて

本研究において作製した急性および慢性尿毒症ラットはいずれも BUN, creatinine, K^+ の著しい上昇とともに毛の粗造化, 末期の出血傾向, 全身の振戦, 筋攣縮, 歩行障害などの異常を認めたが同様な所見は Fishman and Raskin⁹⁾および Swendseid et al.¹⁰⁾によっても報告されている。また, 大脳皮質水分含量および蛋白質量には変化を認めなかったが, これは尿毒症における脳浮腫の存在を否定した Arieff et al.¹¹⁾および Olsen¹²⁾の成績と一致する知見といえよう。

また血清アミノ酸についてみると, Asp, Gly, 3-methylhistidine, urea, citrulline, α -amino adipic acid, cystine, GABA の増加, 逆に Glu, Leu, Lys, Trp, Tyr, Val および Tyr/Phe 比, Val/Gly 比, EA/NEA 比の低下を認めた。従来, 腎不全においては urea, creatinine などの代謝性アミノ酸のほか多くの血清アミノ酸の変動が報告されている。^{10,13-15)}しかし, 血清アミノ酸は腸管からの吸収, 肝・筋における代謝, 腎による排泄のほか食餌摂取条件などの修飾を受けるため常に一定の変動を認めるとは限らず報告者により多少の差異がみられるが, EA の減少と NEA の増加傾向, Tyr/Phe 比の低下, Val/Gly 比の低下などは尿毒症における特徴的パターンとして知られている。¹⁵⁾本研究においても同様に EA/NEA 比, Tyr/Phe 比および Val/Gly 比の有意の低下を確認した。以上の尿毒症症候群の出現状況および血清アミノ酸の変動面からみて, 尿毒症性脳症におけるアミノ酸代謝を研究するうえで適当なモデルと考えられる。

4.2 大脳皮質アミノ酸の変動について

尿毒症ラット大脳皮質において Asp, Gln, Gly, His, ornithine, Phe, phosphoethanolamine, taurine, urea, 1-methylhistidine, 3-methylhistidine の増加

carnosine, Glu, Arg の減少を認めた。これまで尿毒症における脳のアミノ酸濃度については Schmid et al.¹⁶⁾ が本実験と同様に His の有意の上昇を、また Siassi et al.¹⁷⁾ が Trp の減少傾向を認めたとする報告以外には見あたらない。髄液中アミノ酸については Mütting and Dishuk¹⁸⁾ が慢性腎不全患者例で測定した報告があるが、Asp, Gln, Gly, Glu, His, Phe の上昇を認めており、Glu を除いて本実験で得られた大脳皮質アミノ酸の成績に類似する傾向を示したことは興味深い。

尿毒症においては脳血液関門および脳脊髄液関門の非特異的な透過性亢進が認められるが、¹⁹⁾ 血清中に増加した Asp, Gly, 3-methylhistidine, urea は脳においてもいずれも有意に上昇しており、脳アミノ酸の変動の一部は血清アミノ酸濃度および脳血液関門透過性変化の影響を受けることを推測させる。しかし血清では上昇しなかった必須アミノ酸 His および Phe も脳では増加しており、血中から脳への移行増大のみでは説明できない。Carnosine は β -alanine および His より carnosine synthetase により合成されるが尿毒症脳で His が上昇し carnosine が低下したことはこの酵素活性が低下していることを示唆する。一方、Arg は脳において Glu および proline より ornithine を介して合成され得るが、尿毒症脳での ornithine 上昇および Arg 低下は ornithine から Arg への合成過程の障害の可能性も考えられよう。いずれにしても尿毒症脳では複雑なアミノ酸代謝障害が存在することは確実であるが、各アミノ酸の変動の機序については今後さらに検討が必要と考えられる。

脳の主要アミノ酸である Glu, Gln, Asp, GABA についてみると Gln, Asp は増加、Glu は減少、GABA は不変という結果であった。これらのアミノ酸は Glu を起点とする TCA cycle と GABA shunt の構成アミノ酸として密接に関連することから、以下には大脳皮質切片を L-¹⁴C-glutamate とともに incubate した実験成績ともあわせて、尿毒症脳における Glu 代謝について考察を加えたい。

4.3 尿毒症脳における glutamate 代謝について

本研究において尿毒症ラットの大脳皮質切片による L-[U-¹⁴C]glutamate の取り込みは正常ラットに比し急性群では 45.8%, 慢性群では 21.2% であり、とくに後者において著明な低下を認めた。

Glu の脳切片による取り込みは特別の pump 機構を必要とせず、Na⁺/K⁺pump により形成される濃度勾配に従って Na⁺ が細胞内へ流入する際に Glu も相伴って同様に細胞内へ取り込まれると考えられている。²⁰⁾ それゆ

え脳切片による Glu の取り込みは細胞外 Na⁺ 濃度に依存し、それが増加すると細胞内への Glu 移行も促進される。²¹⁾ また、尿毒症脳においては Na-K activated ATPase 活性の低下²²⁾ および Na⁺ の血液から脳への移行減少⁹⁾ が報告されている。したがって尿毒症脳における Glu 取り込み減少は Na-K ATPase 活性の低下により細胞内への Na⁺ 流入が減少することによる可能性が推測される。

また Fishman and Raskin⁹⁾ は、尿毒症ラットでは脳の膜透過性異常が存在し sucrose や inulin のような非荷電性物質に対する透過性は亢進するのに対し、弱有機酸である penicillin の脳内への移行が低下することを見いだしたが、腎障害により血中に増加した有機酸が脳内へ移行・蓄積しその結果、penicillin の脳内移行を障害すると説明している。Glu は酸性アミノ酸であり大脳皮質切片への取り込みに際し penicillin と同様の阻害機序が働く可能性もあろう。

Glu は中枢神経細胞に対し興奮作用を示し、²³⁾ 神経伝達物質として神経終末よりシナプス間隙へ放出され、そののち glia および一部は神経終末より取り込まれると考えられている。脳切片による Glu の取り込みは主に glia によって行われるが、²⁴⁾ 尿毒症脳では glia による Glu の取り込み機序が障害され、神経細胞は高濃度の Glu にさらされる。その結果、神経細胞の異常興奮が引き起されるとすれば、Glu の代謝異常が被刺激性亢進や痙攣などの神経症状の出現に関与する可能性も考えられよう。

さて、¹⁴C-glutamate より個々のアミノ酸画分および CO₂ への放射能の導入を観察すると、尿毒症群において CO₂, GABA および Gln は増加、Asp, Glu は減少しておりその変化は慢性群でより著明であった。

脳におけるアミノ酸代謝系は Glu に集中しておりその主な代謝経路を参考のため Fig. 9 に示した。

尿毒症脳では Glu 濃度およびそれへの放射能取り込み率のいずれも低下するが、¹⁴CO₂ 産生能は正常よりも増加していた。この事実は ¹⁴C-glutamate の脳皮質切片への取り込みは低下しているにもかかわらず、¹⁴CO₂ 産生能でみるかぎり一度取り込まれた Glu は切片内では利用障害なく代謝されるものと理解される。

Glu の代謝経路のうち Asp についてみると尿毒症脳では Asp 濃度は増加しているが放射能取り込みは著明に低下していた。¹⁴C-glutamate から Asp への放射能の移行は主に反応②によりアミノ基転移を受けたのち、 α -ketoglutarate としてその炭素骨格を TCA cycle へ与え succinate, oxaloacetate を経て再び反応②により

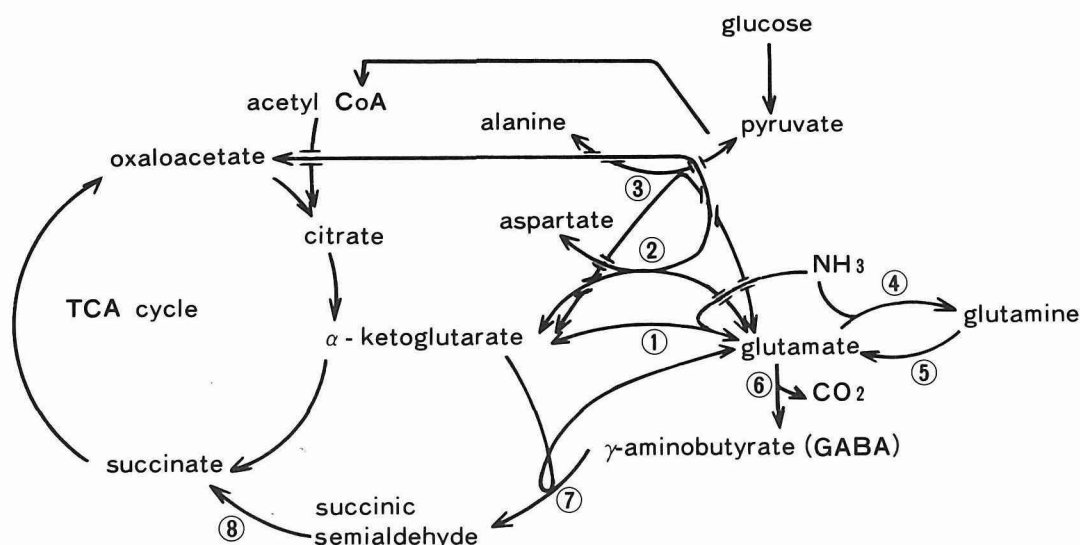


Fig. 9 Metabolism of glutamate in the brain

Aspへ取り込まれる経路をとる。²⁵⁾尿毒症脳におけるAsp放射能の低下はTCA cycle反応系の障害を示すものと考えられる。

これに対しGABAの濃度は変化せず、その放射能取り込み率はむしろ増加を示した。脳においてはGABAはGluより脱炭酸反応により合成された後、succinic semialdehydeを経てsuccinateとなりTCA cycleへ入る。この反応⑥、⑦、⑧は脳に特有な経路でTCA cycleの中で α -ketoglutarateとsuccinateの間に別経路を形成しておりGABA shuntと呼ばれ、 α -ketoglutarateの10~40%はこのshuntを介して酸化されるとみなされている。^{25,26)}本研究の成績は、尿毒症脳においてGABA shuntは良く保たれていることを示しており、さらにTCA cycleの障害をGABA shuntが代償している可能性も考えられよう。

次にGlnについてみると尿毒症脳では濃度、放射能取り込み率ともに上昇しており、Gln合成(反応④)が活発に行われていることを示している。Quintanilla et al.²⁷⁾は尿毒症ラット肝においてGlnの合成亢進が起ることを認めており、肝におけると同様の機転が脳においても働いているものと思われる。また、Bianchi-Porro and Maiolo²⁸⁾は尿症患者では血液より脳へのammonia移行が増大していると報告している。脳におけるammonia処理系としては反応①、④がありとくに後者が主要なものと考えられているが、²⁹⁾ammoniaの脳による取り込み増加は尿毒症脳におけるGln合成の亢進という本研究での成績により説明可能である。

また尿毒症脳においてはglucose利用障害が存在する

が、^{30,31)}glucoseに代わりenergy源として利用可能なGluがTCA cycleで利用されず、ATPを必要としenergy代謝的には不利なGln合成により多く代謝されることは、尿毒症脳におけるenergy代謝をさらに悪化させ尿毒症性脳症の発見に關与する可能性も考えられる。

以上の所見を要約し尿毒症脳におけるGlu代謝動態をまとめるとFig. 10のように理解されえよう。

5 結 論

尿毒症性脳症の実験モデルとして、ラットに両側尿管結紮を施し急性尿毒症を、また一側腎摘出、他側腎部分切除により慢性尿毒症を作製し、glutamateを中心とする脳アミノ酸の代謝について検討し以下の知見を得た。

1) 尿毒症ラットでは血清BUN, creatinine, K^+ の上昇に伴い毛の粗造化、全身の振戦、筋攣縮、歩行異常、刺激に対する反応性の亢進ないし鈍麻、末期の出血傾向などの異常が観察された。

2) 尿毒症ラット大脳皮質の水分および蛋白質含量は正常ラットと差がなく脳浮腫は認めなかった。

3) 尿毒症ラットの血清アミノ酸は多彩な変動を認めた。有意の濃度増加を示したアミノ酸はAsp, Gly, 3-methylhistidine, urea, citrulline, α -amino adipic acid, cystine, GABA, 逆に減少したのはLys, Leu, Val, Trp, Tyr, Glu, Tyr/Phe比, Val/Gly比, EA/NEA比である。これらの変動は急性群と慢性群の間で本質的な差は認められなかった。

4) 尿毒症ラット大脳皮質アミノ酸にも多彩な変動

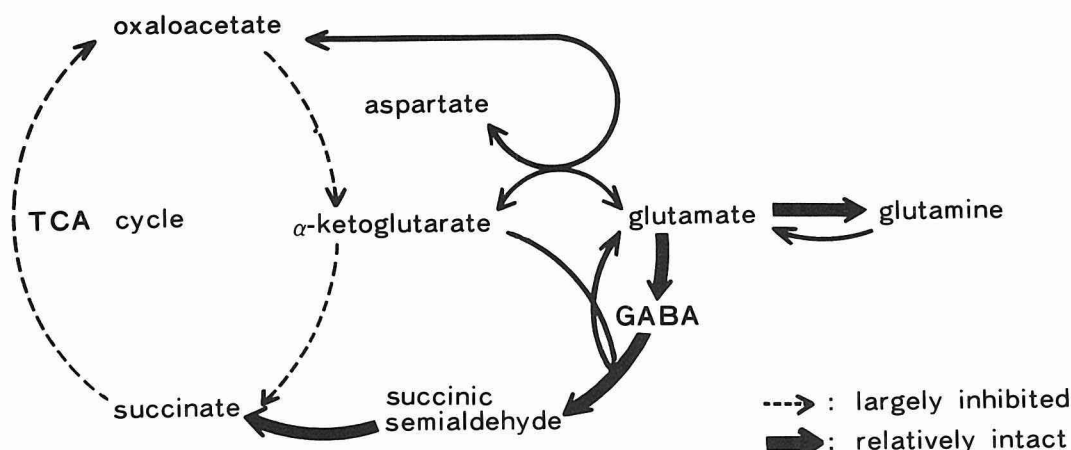


Fig. 10 Metabolic pathway of glutamate in uremic brain

を認めた。血清アミノ酸の変化と同様に急性群と慢性群の間には本質的な差はみられなかった。Asp, Gln, Gly, His, ornithine, Phe, phosphoethanolamine, taurine, urea, 1-methylhistidine, 3-methylhistidine は有意に増加し, Arg, Glu, carnosine は減少を示したが, GABA には変化を認めなかった。

5) 大脳皮質切片による L-[U- ^{14}C]glutamate の取り込みは尿毒症ラットで著明な低下を認めた。その程度は慢性群でより著明であった。

6) 各アミノ酸への ^{14}C 放射能の取り込みは Glu, Asp, Gln, GABA に, また CO_2 に認められた。尿毒症ラットにおける各分画の放射能取り込み率は CO_2 , Gln, GABA で上昇, Glu, Asp では低下を示した。

以上より, 尿毒症において ^{14}C -glutamate の大脳皮質への取り込みは低下するが, 一度取り込まれた glutamate の利用はあまり抑制されていないと考えられ, その代謝経路のうち Gln 合成, GABA 合成はそれほど障害されず, 主な障害は α -ketoglutarate を介する TCA cycle における利用障害にあると考えられる。またこれによる energy 代謝障害を GABA shunt が一部代償している可能性があることを推測した。

稿を終えるにあたり, 種々ご助言をたまわった和田武雄学長, ご指導いただいた松本博之助教授に謝意を表します。

なお本研究の一部は北海道老年医学振興会の助成により行われた。

文 献

1. Baker, A. B. and Knuston, J.: Psychiatric aspects of uremia. *Am. J. Psychiatry*. **102**, 683-687 (1946).
2. Locke, S., Merrill, J. P. and Tyler, H. R.: Neurologic complications of acute uremia. *Arch. Intern. Med.* **108**, 75-86 (1961).
3. Tyler, H. R.: Neurologic disorders in renal failure. *Am. J. Med.* **44**, 734-748 (1968).
4. Glaser, G. H.: Brain dysfunction in uremia. *Brain Dysfunction in Metabolic Disorders* **53**, 173-199 (1974).
5. Raskin, N. H. and Fishman, R. A.: Neurologic disorders in renal failure. *N. Engl. J. Med.* **294**, 143-148 (1976).
6. Nissenson, A. R., Levin, M. L., Klawans, H. L. and Nausieda, P. L.: Neurological sequelae of end stage renal disease. *J. Chronic Dis.* **30**, 705-733 (1977).
7. Davidson, N.: *Neurotransmitter Amino Acids*, Academic Press, New York (1976).
8. Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275 (1951).
9. Fishman, R. A. and Raskin, N. H.: Experimental uremic encephalopathy. *Arch. Neurol.* **17**, 10-21 (1967).
10. Swendseid, M. E., Wang, M., Vyhmeister, I., Chan, W., Siassi, F., Tan, C. F. and Kopple, J. B.: Amino acid metabolism in the chronically uremic rat. *Clin. Nephrol.* **3**, 240-246 (1975).
11. Arieff, A. I., Guisado, R. and Mussry, S. G.: Uremic encephalopathy: Studies on biochemical alterations in the brain. *Kidney Int. Suppl.* **2**, 194-200 (1975).
12. Olsen, S.: The brain in uremia. *Acta Psychiatr. Scand. Suppl.* **156**, 1-128 (1961).

13. Glyassy, P. F., Aviran, A. and Peters, J. H.: Evaluation of amino acid and protein requirement in chronic uremia. *Arch. Intern. Med.* **126**, 855-859 (1970).
14. Luke, R. G., Rees, E. D., Winternitz, W. W. and Burchett, T.: Abnormal metabolism of amino acids in uremia. *Proc. Eur. Dial. Transplant Assoc.* **10**, 152-159 (1973).
15. Kopple, J. D. and Swendseid, M. E.: Protein and amino acid metabolism in uremic patients undergoing maintenance hemodialysis. *Kidney Int.* **7**, 64-72 (1975).
16. Schmid, G., Przuntep, H., Fricke, L., Heidland, A. and Hampel, K.: Increased histidine and histamine content in the brain of chronic uremic rats. Cause of enhanced cerebral cyclic adenosine monophosphate in uremia? *Am. J. Clin. Nutr.* **31**, 1665-1668 (1978).
17. Siassi, F., Wang, F., Kopple, J. D. and Swendseid, M. E.: Brain serotonin turnover in chronically uremic rats. *Am. J. Physiol.* **232**, E526-E528 (1977).
18. Mütting, D. and Dishuk, B. D.: Free amino acids in serum, cerebrospinal fluid and urine in renal disease with and without uremia. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **126**, 754-758 (1967).
19. Freeman, R. B., Scheff, M. F., Maher, J. F. and Schreiner, G. E.: The blood-cerebrospinal fluid barrier in uremia. *Ann. Intern. Med.* **56**, 233-240 (1962).
20. Krjeic, K.: Glutamate and γ -aminobutyric acid in brain. *Nature* **228**, 119-124 (1970).
21. Baker, P. F. and Potashner, S. J.: The dependence of glutamate uptake by carb nerve on external Na^+ and K^+ . *Biochim. Biophys. Acta* **249**, 612-616 (1971).
22. Minkoff, L., Gaertner, G., Mercier, C. and Levin, M. L.: Inhibition of brainsodium-potassium ATP ase in uremic rats. *J. Lab. Clin. Med.* **80**, 71-78 (1972).
23. Curtis, D. R. and Watkins, J. C.: The pharmacology of amino acids related to gamma-aminobutyric acid. *Pharmacol. Rev.* **17**, 347-391 (1965).
24. Benjamin, A. M. and Luastel, J. H.: Fate of L-glutamate in the brain. *J. Neurochem.* **23**, 457-464 (1974).
25. Haslam, R. J. and Krebs, H. A.: The metabolism of glutamate in homogenates and slices of brain cortex. *Biochem. J.* **88**, 566-578 (1963).
26. Elliott, K. A. C.: γ -aminobutyric acid and other other inhibitory substances. *Br. Med. Bull.* **21**, 70-75 (1965).
27. Quintanilla, A., Socambaugh, G. E., Gibson, T. P. and Craig, R.: Glucose metabolism in uremia. *Am. J. Clin. Nutr.* **33**, 1446-1450 (1980).
28. Bianchi Porro, G. and Maiolo, A. T.: Cerebral ammonia metabolism in uremia. *Life Sci.* **9**, 43-50 (1970).
29. Richter, D. and Dowson, R. M. C.: The ammonia and glutamine content of the brain. *J. Biol. Chem.* **176**, 1199-1210 (1948).
30. Valovicova, E., Spustova, V., Dzurik, R. and Cernaek, P.: The utilization of glucose in brain slices during uremia. *Intern. Urol. Nephrol.* **6**, 239-242 (1968).
31. van den Noort, S., Eckel, R. E., Brine, K. and Hrdlick, J. T.: Brain metabolism in uremic and adenosine-infused rats. *J. Clin. Invest.* **47**, 2133-2142 (1968).

別刷請求先:

(〒060) 札幌市中央区南1条西16丁目

札幌医科大学内科学第1講座 菊池 進